



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och
jordbruksvetenskap

Fungiciders påverkan på oosporbildning hos *Phytophthora* *infestans*

The impact of fungicides on the formation of oospores by *Phytophthora*
infestans

André Johansson

Institutionen för skoglig mykologi
och växtpatologi
Agronomprogrammet – Mark/växt
Kandidatarbete 15HP
Uppsala 2017

Fungiciders påverkan på oosporbildning hos *Phytophthora infestans* –

The impact of fungicides on the formation of oospores by *Phytophthora infestans*–

André Johansson

Handledare: Lina Sjöholm, SLU/inst. för skoglig mykologi och växtpatologi.

Biträde handledare: Björn Andersson, SLU/inst. för skoglig mykologi och växtpatologi.

Examinator: Hanna Friberg, SLU/inst. för skoglig mykologi och växtpatologi.

Omfattning: 15 HP

Nivå och fördjupning: G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i biologi - kandidatarbete

Kurskod: EX0689

Program/utbildning: Agronomprogrammet – Mark/växt

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Phytophthora infestans*, oospor, potatisbladmögel, fungicid, cyazofamid

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Sammanfattning

Potatisbladmögel är en allvarlig växtsjukdom som orsakas av oomyceten *Phytophthora infestans*. Denna växtpatogen har både asexuell och sexuell förökning. För att sexuell förökning ska uppstå krävs att de båda parningstyperna, A1 och A2, är närvarande. Sexuell förökning ger upphov till tjockväggiga och persistenta oosporer. Oosporbildningen har i tidigare studier visats bli påverkad av fungicider på olika sätt, men det finns ingen vetenskaplig konsensus för huruvida fungicider ökar eller minskar bildningen av oosporer. I detta försök samlades potatisblad av sorten Kuras som var infekterade av *P. infestans* in från ett fältförsök, där ett led behandlades enligt ett rekommenderat sprutprogram (K2) och ett led var obehandlat (K0). De insamlade proverna isolerades, parningstypsbestämdes och korsades enligt en korsningsmatris. Alla korsningar gjordes både på agar med inblandad fungicid (Ranman Top, aktiv substans cyazofamid) och på agar utan fungicid.

Resultatet visade att det inte fanns någon skillnad i oosporbildning mellan korsningar gjorda på agarplattor med respektive utan fungicid. Däremot gav korsningar som innehöll minst ett isolat från K2 fler oosporer än korsningar med två isolat från K0, men bara vid odling på agar utan fungicid. Detta indikerar alltså att isolat av *P. infestans* som överlevt fungicidbehandling i fält bildar mer oosporer när de odlas på artificiellt medium utan inblandning av fungicid. Att K2 inte bildade fler oosporer på agarplattorna med fungicid kan antas bero på en trade-off-effekt mellan högre myceltillväxt och oosporbildning. För framtida studier hade det varit av intresse att även undersöka kopplingen mellan aggressivitet och oosporbildning hos olika isolat av *P. infestans*.

Nyckelord: Phytophthora infestans, oospor, potatisbladmögel, fungicid, cyazofamid

Abstract

Potato late blight is a devastating plant disease caused by the oomycete *Phytophthora infestans*. This pathogen can reproduce both asexually and sexually. For sexual reproduction to take place, both mating types (A1 and A2) must be present. Sexual reproduction results in thick-walled and persistent oospores. In earlier studies, the formation of oospores has been shown to be affected by fungicides in different ways but there is no scientific consensus on how it is affected. In this experiment, potato leaves of the variety Kuras infected by *P. infestans* were collected from field trial plots treated with fungicides according to a spraying program (K2) and from untreated plots (K0). The samples were isolated, the mating type of the isolates were determined and then crossed according to a matrix. All crossings were done on both agar containing fungicide (Ranman Top, active ingredient cyazofamide) and agar without the fungicide.

The results showed no difference in oospore formation between crossings done on agar with fungicide compared to crossings on agar without fungicide. However, crossings containing at least one isolate from K2 resulted in more oospores than crossings containing two isolates from K0, but only when grown on fungicide free agar. This indicates that isolates of *P. infestans* that have survived treatment with fungicides in the field, produce more oospores when they are grown on artificial medium free of fungicides. The fact that K2 did not form more oospores on agar treated with fungicide was assumed to be due to a trade-off effect between a higher growth rate of the mycelia and formation of oospores. Future studies could investigate the connection between the aggressiveness and ability to form oospores in different isolates of *P. infestans*.

Keywords: *Phytophthora infestans*, oospore, potato late blight, fungicide, cyazofamid

Innehållsförteckning/Table of contents

1	Inledning	6
1.1	Potatisbladmögel	6
1.2	Biologi	7
1.3	Fungicider och oosporer	8
2	Material och metoder	10
2.1	Insamling av infekterade blad	10
2.2	Isolering av insamlade prover	10
2.3	Typbestämning av insamlade isolat	11
2.4	Korsning av typbestämda isolat	11
2.5	Fungicidbehandling av agarplattor	12
2.6	Räkning av oosporer	12
2.7	Statistik	13
3	Resultat	14
4	Diskussion och slutsats	22
4.1	Metoddiskussion	22
4.1.1	Typbestämning av insamlade isolat	22
4.1.2	Korsning av typbestämda isolat	22
4.1.3	Fungicidbehandling av agarplattor	23
4.1.4	Räkning av oosporer	23
4.2	Resultatdiskussion	24
4.3	Slutsats	26
	Referenslista	27
	Tack	29

1 Inledning

1.1 Potatisbladmögel

Potatisbladmögel, som orsakas av oomyceten *Phytophthora infestans*, anses vara en av de allvarligaste sjukdomarna på potatis. Bladmögel drabbar potatisodlingar runtom i världen (Sjöholm *et al.*, 2013). *Phytophthora infestans* anses ha sitt ursprung i Mexico, och spreds till Europa under 1800-talet via importerade knölar som bar smittan (Andersson & Sandström, 2000).

Angrepp av *P. infestans* visar sig oftast först i form av små fläckar på de nedre bladen på potatisplantan. Under fuktiga förhållanden kan dessa fläckar snabbt växa och bilda stora svart-bruna fläckar på bladen som breder ut sig ojämnt. Längs kanterna av fläckarna växer ett vitt mögel på undersidan av bladen. Om förhållandena fortsätter vara gynnsamma för patogenen, kan alla överjordiska delar av plantan totalförstöras inom några dagar (Fry, 2008). Att sjukdomen är allvarlig belyses även genom den stora kostnaden för bekämpning och förlorad inkomst på grund av minskad skörd som globalt beräknas vara över tre miljarder USD per år (Fry, 2008).

Symtomen på knölar som angrips består av lila- eller brunaktiga fläckar på skalet som beror på mörk och missfärgad vävnad som sträcker sig 5-15mm in i knölen. Senare blir dessa fläckar fasta, torra och lite nedsjunkna, och kan täcka en del av eller hela knölen, oftast utan att gå djupare in i vävnaden (Agrios, 2005). Rötan kan fortsätta utvecklas även efter skörd, och fungerar ofta som inkörsport för andra patogener som kan infektera knölen och ge upphov till olika typer av blöta rötter (Cooke & Little, 2002). Konsekvenserna av angrepp är alltså både en minskad skörd och att knölarna drabbas av brunröta, vilket leder till kraftigt försämrad knolkvalitet (Andersson & Sandström, 2000).

1.2 Biologi

Phytophthora infestans har både asexuell och sexuell förökning. Den asexuella förökningen sker genom bildning av sporangier som möjliggör en snabb spridning under odlingssäsongen så länge mottaglig växt-vävnad finns att tillgå. Sporangierna sprids med vatten, vind (Fry, 2008), eller med hjälp av leddjur som kan agera vektorer (Tyler, 2002). Hamnar ett sporangium på frisk vävnad (blad eller stjälk) kan det infektera potatisplantan genom att gro direkt (Fry, 2008). Den bildade groddslangen från sporangiet kan penetrera bladet direkt genom att spetsen sväller och bildar ett appressorium. Efter infektion växer mycelet mellan cellerna och haustorier bildas som växer in i cellerna (Avrova *et al.*, 2008). Sporangierna kan också differentieras till zoosporer, 5 till 10 stycken per sporangium (Mizubuti & Fry, 1998) som i sin tur kan gro och bilda hyfer som tränger in och infekterar växten. Zoosporer har två flageller och kan förflytta sig i vatten. Bildningen av zoosporer induceras av vatten och hög fuktighet (Tyler, 2002), samt vid relativt låga temperaturer (10 till 15 °C). Är temperaturen däremot högre (20 till 25 °C) är det vanligare att sporangiet gror utan att bilda zoosporer. Symptom kan bli synliga för ögat redan efter två dygn efter infektion. I de bildade lesionerna bildas nya sporangier och därmed är cykeln för klonal förökning komplett (Fry, 2008). Utan sexuell förökning är övervintringen av *P. infestans* begränsad till att överleva som mycel i infekterade knölar. Den kan sedan föröka sig och spridas i fält om man använder smittat utsäde eller när smittade knölar ger upphov till infekterade överliggare (Drenth *et al.*, 1995).

Phytophthora infestans är en heterotallisk oomycet och den sexuella förökningen kräver därför att de två olika parningstyperna, A1 och A2, finns närvarande (Fry, 2008). Under lång tid fanns båda parningstyperna bara i Mexico, medan man i resten av världen endast fann A1. I mitten på 1970-talet introducerades A2 i Europa och detta möjliggjorde sexuell förökning även i denna del av världen (Andrison, 1995). När hyfer från två individer av olika parningstyp möts frigörs ett hormon som stimulerar produktion av antheridier och oogonier. Dessa växer ihop och ger upphov till oosporer (Fry, 2008). Oosporer har egenskaper som skiljer sig från sporangier och zoosporer. Den kanske viktigaste är att de är tjockväggiga och kan överleva upp till fyra år i marken (Turkensteen *et al.*, 2000). Oosporer bildas i större utsträckning på stjälkar än i blad hos plantor angripna av båda typerna. Detta antas bero på att denna växtedel överlever längre än bladen vid ett angrepp. Oosporer som överlever i marken kan genom direktkontakt infektera skotten hos de nya plantorna (Andrison, 1995). Hanson & Shattock (1998) fann i ett av sina experiment att fler oosporer bildades när isolaten växte på mer mottagliga potatissorter. Det var dock beroende på efter hur lång tid

oosporerna räknades, och ju längre tid det gick mellan inokulering och räkning av oosporer, desto mindre blev skillnaderna i antal oosporer mellan de mottagliga och de resistenta sorterna. Efter 30 dagar fanns inga signifikanta skillnader i oosporbildning för de olika sorterna. Turkensteen *et al.* (2000) hävdar däremot att infektion hos potatissorter som har viss resistens mot patogenen ger upphov till en större bildning av oosporer än hos sorter som är mycket mottagliga på grund av att de kan stå med angrepp längre utan att helt vissna ner.

Oosporer av *P. infestans* kan överleva i marken vid temperaturer ner till -20 °C (Strömberg *et al.*, 2001), men tål höga temperaturer sämre. Exempelvis dör de efter två timmar vid 46 °C och efter tolv timmar vid 40 °C (Fry, 2008). När oosporer gror ger de upphov till sporangier (Andersson & Sandström, 2000), som i sin tur sedan infekterar värdväxten. I ett försök där grobarheten hos oosporer undersöktes efter 12 dagar låg andelen grodda oosporer mellan 0–16 %. Samma studie visade också att en större andel oosporer grodde när de utsattes för 18 timmar ljus per dygn jämfört med konstant mörker, och att groningen påverkades av olika koncentrationer av näringsämnen i marken. Den optimala temperaturen för bildning av oosporer låg mellan 10–15 °C. Studien visade också att det bildades rikligt med oosporer i populationer med *P. infestans* där kvoten mellan A1 och A2 var 1:9. Detta kan förklaras med att populationerna i Sverige har stor genetisk diversitet och antagligen har varianter med hög benägenhet till sexuell reproduktion selekterats fram (Strömberg *et al.*, 2001).

1.3 Fungicider och oosporer

Oosporbildning hos *P. infestans* påverkas av ett flertal faktorer inklusive hur länge ett isolat hållits på agar, ämnen som producerats av antagonister, rotexudat samt behandling med olika fungicider, exempelvis metalaxyl (Groves & Ristaino, 2000). De två parningstyperna hos *P. infestans* kan jämföras med olika kön. Ett enskilt isolat fungerar dock som både ”hona” och ”hane”, och har förmågan att bilda både oogonier och anteridier (Fry, 2008). Det har dock visats att *P. infestans* i vissa fall kan uppträda homotalliskt, det vill säga att ett isolat kan bilda oosporer utan att växa ihop med en individ av motsatt parningstyp. På detta sätt kan alltså oosporer bildas även asexuellt. (Groves & Ristaino, 2000).

En studie av Mitani *et al.* (2001) visade att behandling av agarplattor med olika koncentrationer av cyazofamid reducerade bildningen av oosporer från *P. infestans*. I deras studie minskade bildningen av oosporer vid 0,005 µg aktiv substans/ml, och upphörde helt vid 0,01 µg aktiv substans/ml. I en annan studie visades det däremot att många olika fungicider, efter en kort exponeringstid, inducerade bildning av oosporer hos *P. infestans* (Groves & Ristaino, 2000). I

studien testades både isolat som var resistent och ett som inte var resistent mot metalaxyl (aktiv substans i vissa bladmögelfungicider). De resistent isolaten uppvisade högre benägenhet att bilda oosporer när de utsattes för stress genom fungicidbehandling. Samma studie visade även att vissa fungicider kunde ge upphov till en förändring av fenotypiskt uttryck vad gäller parningstyp. Kessel *et al*, (2001) visade att flera olika fungicider minskar både bildningen av och grobarheten hos oosporer. Sammanfattningsvis kan man säga att det inte finns någon vetenskaplig konsensus för hur fungicider egentligen påverkar oosporbildningen hos *P. infestans*.

2 Material och metoder

2.1 Insamling av infekterade blad

Potatisblad, infekterade med *P. infestans*, samlades in från ett fältförsök beläget på Mosslunda gård i närheten av Kristianstad. Försökets syfte var att jämföra effekterna av olika doser av fungicider vid behandling mot potatisbladmögel. Sorten som odlades i försöket var Kuras, en stärkelsesort med hög till mycket hög resistens mot potatisbladmögel (*Europotato.org*, 2016). I försöket ingick bland annat ett led behandlat med full rekommenderad dos (K2). Försöket behandlades med ett sprutprogram med upprepad, alternerande sprutning med tre olika fungicider (Ranman Top, Infinito och Revus Top). Den aktiva substansen i:

- Ranman Top är cyazofamid 160g/l
- Infinito är propamocarb (hydroklorid) 625 g/l samt fluopicolide 62,5 g/l,
- Revus Top är 250 g/l mandipropamid.

Infekterade blad som var obehandlade (K0) samlades in från ett sortförsök beläget 10 m från doseringsförsöket. De blad som valdes ut hade en avgränsad lesion orsakad av *P. infestans* men var inte helt uttorkade som en följd av infektion, utan var i relativt god kondition. De insamlade bladen placerades i enskilda plastpåsar.

2.2 Isolering av insamlade prover

Bitar från lesionerna på bladen skars ut och lades på potatisskivor i petriskålar. Skivorna inkuberades sedan under tre dagar i rumstemperatur och därefter överfördes mycel till en råg- ärtagar. Agarrecept för 1 liter agar: 30 g råg, 40 g frusna gröna ärter, 15 g Bactoagar. Rågen blötläggs över natt, och kokas sen i 15 min. Ärterna tillsätts och råg och ärtblandningen kokas i ytterligare 45 min. Råg och ärter silas från och kokvattnet blandas med agar och autoklaveras. Agarn innehöll även antibiotika (0,2 g ampicillin/liter agar och 0,4 ml Pimaricin (10

mg/ml)/liter agar). När isolaten bekräftats rena från kontaminationer, sattes de om på agar utan antibiotika enligt metod beskriven av Jönsson och Olsson (2015).

2.3 Typbestämning av insamlade isolat

Alla isolat odlades upp genom att med steriliserad skalpell skära ut bitar (ca 0,5cm²) av agar med aktivt mycel och placera dessa på två nya petriskålar med råg-ärtagar. På samma sätt odlades referensisolat med känd parningstyp (A1 respektive A2) upp. När isolaten växt ut på plattan, skars lika stora bitar ut från agar med mycel från referensisolaten. Agarbitarna från referensisolat och provisolat placerades sedan cirka 5 cm ifrån varandra på nya agarplattor. Alla provisolat sattes på två skålar med referensisolat A1 resp. A2. När mycel från prov- och referensisolat hade växt ihop efter drygt en vecka kontrollerades förekomsten av oosporer i stereolupp. På så sätt kunde provisolaten typbestämmas eftersom oosporer bildas när två isolat av olika parningstyp växer samman.

2.4 Korsning av typbestämda isolat

När provisolaten hade typbestämts utformades en korsningsmatris baserad på isolat av olika parningstyp som samlats in i obehandlat led (K0) respektive led behandlat med full dos (K2), se tabell 2. Alla provisolat valdes ut slumpmässigt, utom K2-isolaten av parningstyp A2 eftersom att det endast fanns tre stycken av dessa. Alla korsningar gjordes både på plattor innehållande agar med inblandad fungicid och på agar utan fungicid. Korsningen utfördes på samma sätt som vid parningstypsbestämningen. Varje korsning upprepades fyra gånger, vilket resulterade i totalt 288 petriskålar.

Tabell 1 Korsningsmatris för de typbestämda proverna. De isolat som användes i matrisen slumpades fram, varför bara två isolat av K2 av parningstyp A1 användes.

	A2						
A1		K029	K021	K04	K241	K219	K236
K01							
K012							
K032							
K015							
K239							
K234							

2.5 Fungicidbehandling av agarplattor

För att undersöka hur oosporbildning påverkas direkt av en fungicid valdes Ranman Top, ett preparat som används för bladmögelbekämpning, till att användas i lab för agarplattorna med fungicid. Den aktiva substansen i Ranman Top är cyazofamid, 160g/liter. I fält utsattes isolaten även för andra aktiva substanser (se s.10). Preparatet applicerades genom att pipettera 100µl av en vattenlösning av fungicid spädd för att ge 0,01mg aktiv substans per liter agar. Plattorna roterade under pipetteringen, och lösningen spreds ut jämnt över agarytan med hjälp av en glastrackla. Plattorna fick sedan stå några dagar så att fungicidlösningen kunde fördela sig jämt i agarn.

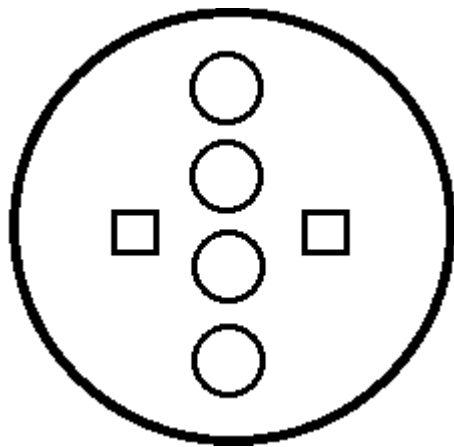
0,01mg aktiv substans per liter agar valdes baserat på en förstudie som Jönsson & Olsson (2015) gjorde. I deras studie provades koncentrationer på 0,1mg/l till 0,001mg/l, där den högre gjorde att mycelet nästan inte växte alls och den lägre gav upphov till nästan obehindrad tillväxt. I försöket rapporterat här valdes en koncentration mellan dessa så att en påverkan av fungiciden skulle vara märkbar, men samtidigt tillåta mycelet att växa så att oosporbildning kunde ske.

2.6 Räkning av oosporer

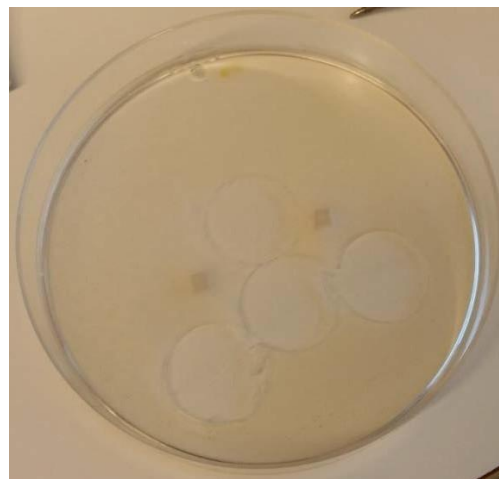
Efter cirka en vecka, när mycel från de olika isolaten hade vuxit ihop kunde räkningen av oosporer påbörjas. Fyra runda bitar stansades ut (ca 2cm i diameter) mellan agarbitarna med provisolat, se bild 2. Om agarn hade flutit ut ojämnt i petriskålen gjordes stansningen för att få så lika volym agar som möjligt mellan proverna. De utstansade agarbitarna placerades i ett falconrör med 10 ml avjoniserat vatten. Denna mängd vatten var avsedd att ge en lämplig koncentration av oosporer att räkna, men som ändå var tillräckligt för att kunna hitta eventuella skillnader mellan de olika korsningarna. Innehållet i falconröret finfördelades med hjälp av en omnimixer. En droppe lades på en Bürkerkammare (se figur 1) och oosporerna räknades i mikroskop. Vid ett tillfälle användes en annan Bürkerkammare med samma volym, vilket resulterade i ett avsevärt större antal oosporer (se figur 4). Ingen räkning av oosporer utfördes på kontaminerade plattor eller på plattor där mycel från de olika isolaten av olika anledningar inte hade växt ihop. Räkningen av oosporer pågick under flera veckors tid.



Figur 1. En Bürknerkammare som användes för att räkna oosporer.



Figur 2. Utstansningsmönster av agarn i en petriskål



Figur 3. Mönstret som agarn stansades ut i vid de tillfällen då den hade flutit ut ojämnt

2.7 Statistik

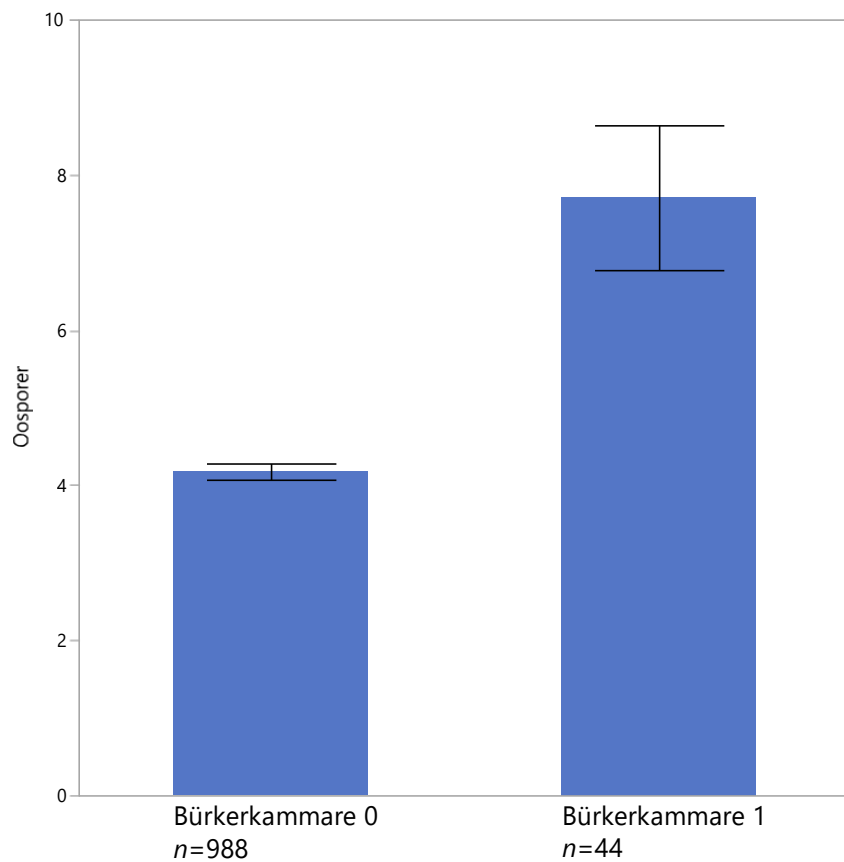
Resultaten från räkningen av oosporer analyserades i programmet JMP Pro 12 (JMP®, version 12, 1989-2007) Signifikansnivån sattes till 95 % och togs fram med hjälp av ANOVA-test. Där signifikanta skillnader fanns användes Student's t för att jämföra olika medelvärden. Då ingen räkning av oosporer gjordes, exempelvis på grund av kontaminering, behandlades detta som ett saknat värde.

3 Resultat

Tabell 2. Resultatet av kontrollen av oosporförekomst. De grönmarkerade raderna är prover som konstaterats vara typ A1 och de rödmarkerade raderna är prover som konstaterats vara typ A2. Siffrorna under K0 och K2 är en beteckning för isolatet

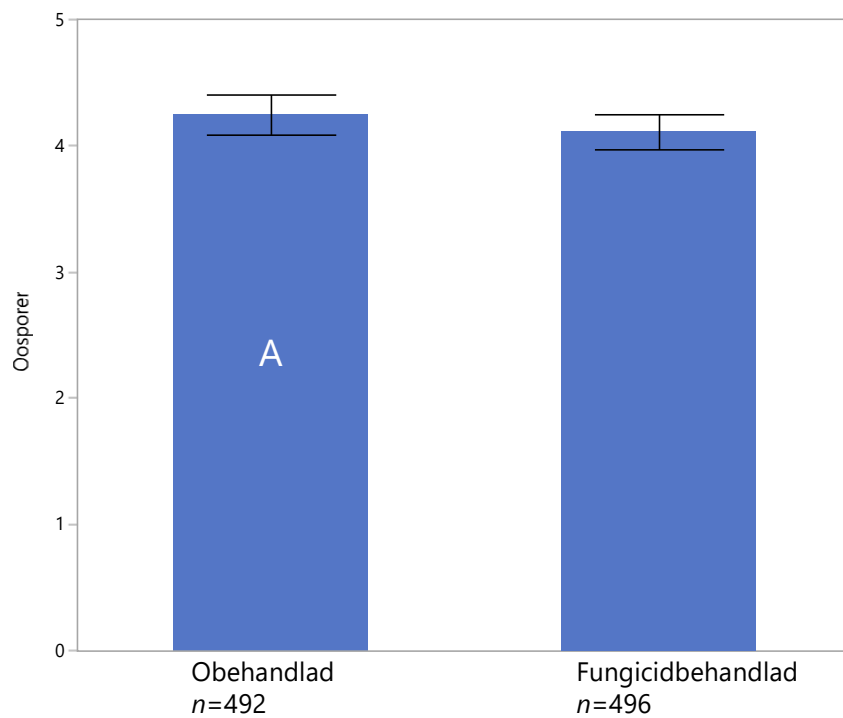
A1		A2	
K0	K2	K0	K2
1	34	2	19
6	39	3	36
8	42	4	41
9		21	
12		29	
13		33	
14		44	
15			
20			
25			
32			

Efter typbestämningen av isolaten framgick vilka isolat som var av typ A2 och typ A1 (tabell 2). Det var även fem isolat (fyra stycken K2 och en K0) som bildade oosporer vid korsning med båda referensisolaten (A1 och A2). De användes inte i resten av försöket.



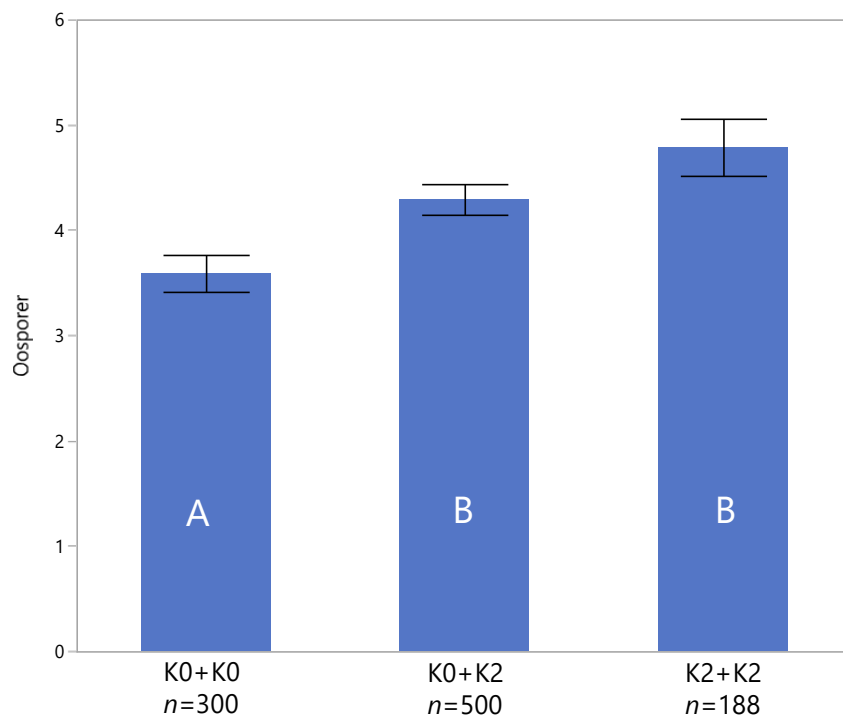
Figur 4. Antalet bildade oosporer räknade i två olika Bürkerkammare. Signifikant fleroosporer räknades när Bürkerkammare 1 användes. Staplarna visar medel \pm medelfel.

Skillnaden i antal bildade oosporer skiljde sig åt signifikant, beroende på Bürkerkammare ($p < 0,0001$; fig. 4). För att få konsekventa resultat har alla resultat från de korsningar som togs fram med Bürkerkammare 1 (44 av 1032 räkningar) uteslutits ur analyserna.



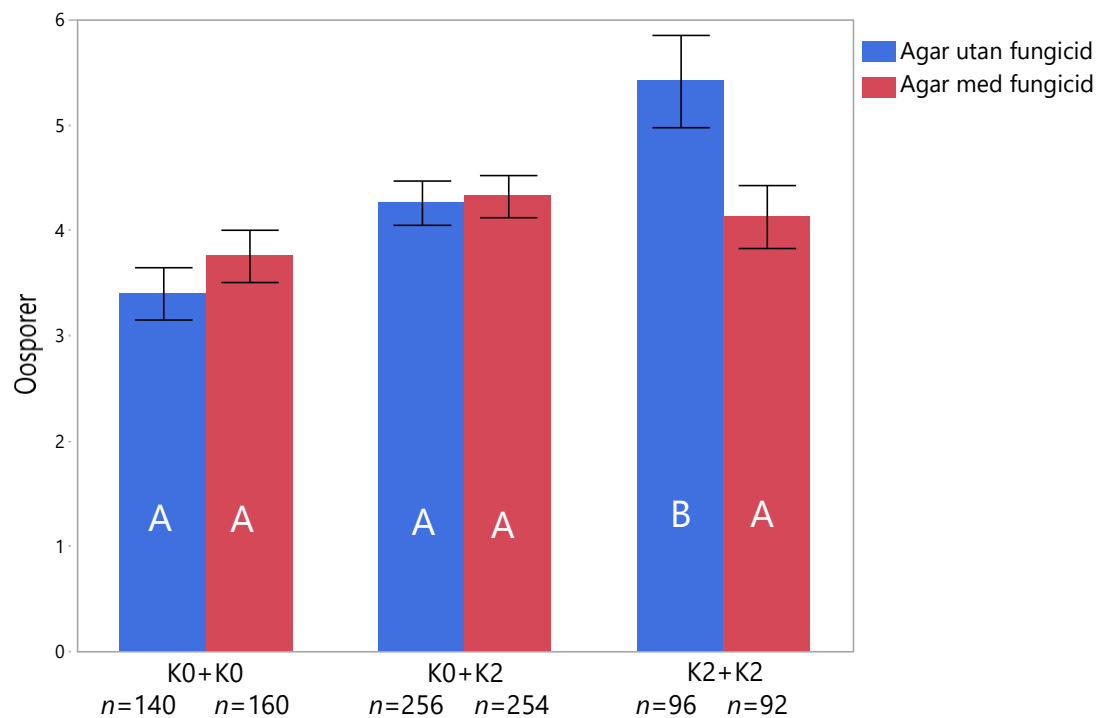
Figur 5. Oosporbildning från korsningar av isolat av *P. infestans* som vuxit på fungicid- respektive obehandlade agarplattor. Staplar betecknade med samma bokstav är inte signifikant åtskilda vid 95 % signifikansnivå (Student's t-test) Diagrammet tar inte hänsyn till vilken typ av korsning det är (K0+K0, K0+K2 eller K2+K2). Staplarna visar medel \pm medelfel. $p=0,5155$

Oosporbildningen på agar, oberoende av vilken typ av korsning det var (K0+K0, K0+K2 eller K2 +K2) skiljde sig inte signifikant mellan agar med, respektive utan fungicid (fig. 5).



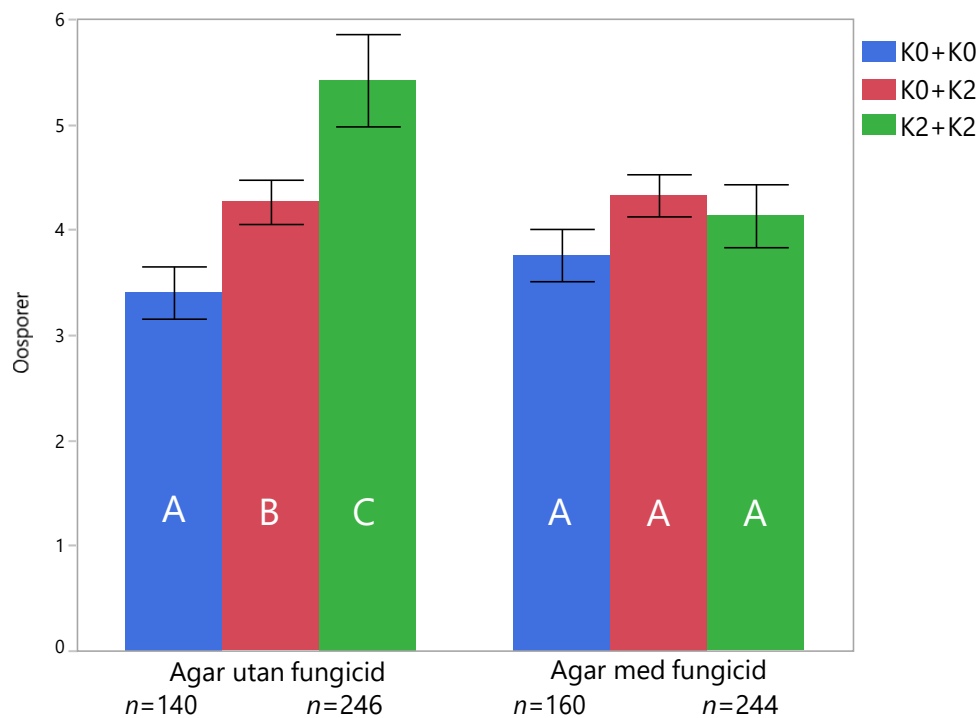
Figur 6. Oosporbildning vid korsning av *P. infestans*-isolat som behandlats olika i fält (K0=ej fungicidbehandlade isolat, K2=fungicidbehandlade isolat). Ingen hänsyn är tagen till om isolaten korsades på agarplatta med eller utan fungicid. Staplar betecknade med samma bokstav är inte signifikant åtskilda vid 95 % signifikansnivå (Student's *t*-test). Staplarna visar medel \pm medelfel.

Oosporbildningen skiljde sig signifikant åt mellan mellan de olika korsningarna. En korsning där minst en K2 (fungicidbehandling i fält) var inblandad ledde till signifikant fler oosporer än en korsning mellan bara K0-isolat (ingen fungicidbehandling i fält) (fig. 6).



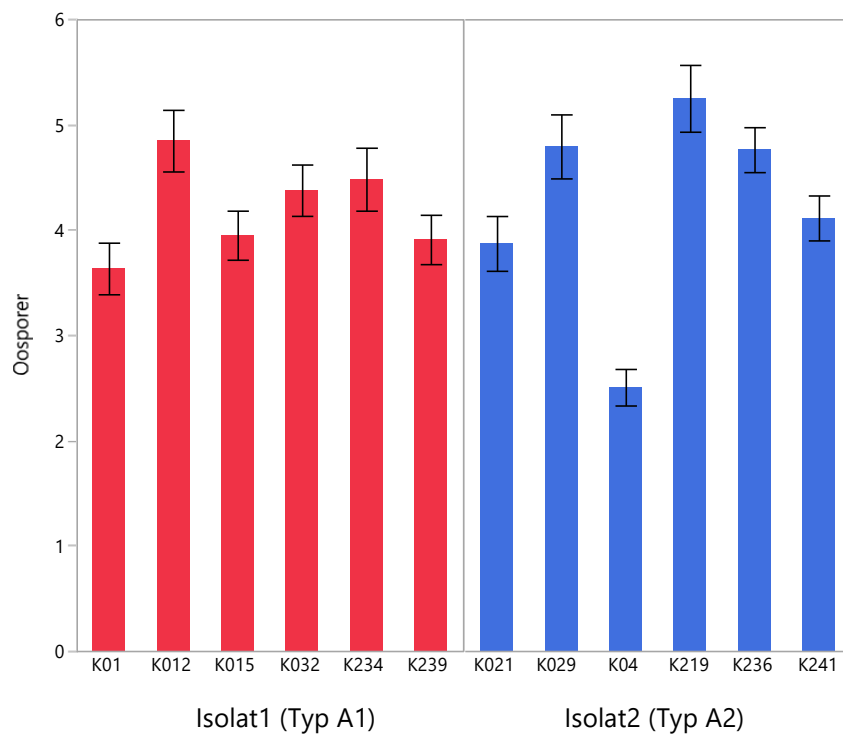
Figur 7 Oosporbildning vid korsning av *P. infestans*-isolat som behandlats olika i fält (*K0*=ej fungicidbehandlade isolat, *K2*=fungicidbehandlade isolat) vid korsning på fungicidbehandlade respektive obehandlade agarplattor. Staplar betecknade med samma bokstav är inte signifikant åtskilda vid 95 % signifikansnivå inom korsningsgrupp (*K0*+*K0*, *K0*+*K2* eller *K2*+*K2*). Staplarna visar medel \pm medelfel.

Delas oosporbildningen upp på agarplattor med respektive utan fungicid för de tre olika typerna av korsning, syns att korsningar av isolat från *K2* bildade signifikant fler oosporer i agarplattor utan fungicid, jämfört med på plattor med fungicid (fig. 7).



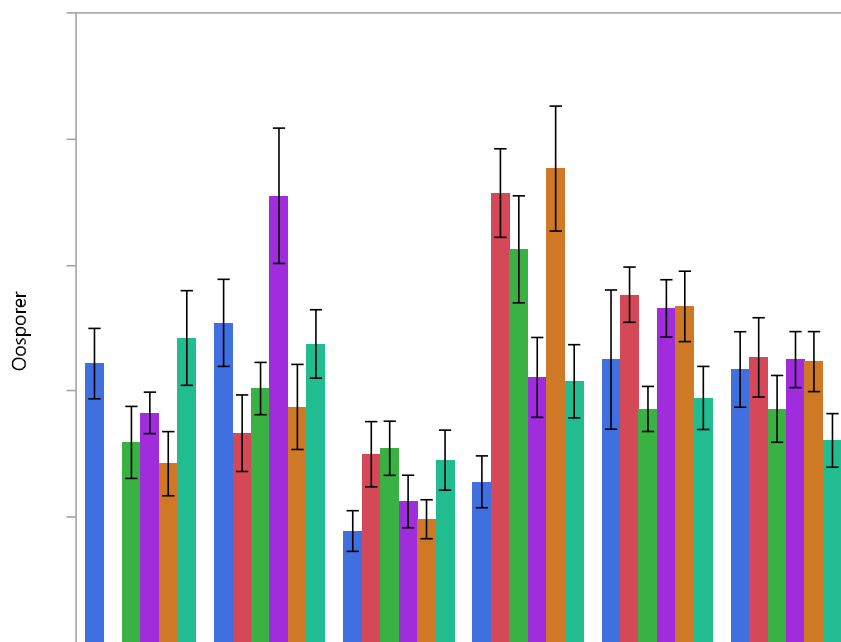
Figur 8 Medelvärdet för oosporbildning vid korsning av *P. infestans*-isolat som behandlats olika i fält (K0=ej fungicidbehandlade isolat, K2=fungicidbehandlade isolat) samt vid korsning på fungicidbehandlade respektive obehandlade agarplattor. Olika färg kodar för olika typer av korsning. Staplar betecknade med samma bokstav är inte signifikant åtskilda vid 95 % signifikansnivå inom agargrupp. (Student's *t*-test). Staplarna visar medel \pm medelfel.

Delas oosporbildningen upp på behandlingarna i fält och om de korsats på agar med eller utan fungicid, syns signifikanta skillnader mellan de olika korsningarna när de odlats på plattor utan fungicid. Inga signifikanta skillnader finns mellan korsningarna när de odlats på agar med fungicid. I det obehandlade ledet ger K2+K2 upphov till fler oosporer än K2+K0 som i sin tur ger upphov till fler oosporer än K0+K0 (fig. 8).



Figur 9. Medelvärde för oosporbildning för varje isolat av *P. infestans* oavsett behandling på agarplattor eller i fält. (medel±medelfel).

Skillnaderna i oosporbildning mellan alla korsningar där ett visst isolat varit med är inte alltid statistiskt signifikanta, men det är ändå värt att notera att bland isolaten av typ A1 verkar K01 bildat minst oosporer och K012 verkar ha bildat mest oosporer. Motsvarande bland isolaten av typ A2 är K04 och K219 (fig.9).



Figur 10. Medelvärde för oosporbildning för isolat av *P. infestans* av isolat 2 (parningstyp A2) beroende på vilket av isolat 1 (parningstyp A1) det har korsats med. (medel ± medelfel)

De isolat som bildade minst (K04 och K01) och flest (K012 och K219) oosporer i figur 9 ger inte minst/flest antal oosporer i alla korsningar. Exempelvis är den blåa stapeln (K01) inte alltid den kortaste i en grupp, och den röda stapeln (K012) är inte alltid den högsta (fig 10). Olika isolat verkar ha varierande påverkan på oosporbildningen beroende på vilket annat isolat i en population det korsas med. Olika kombinationer av föräldrar påverkar alltså oosporbildningen.

4 Diskussion och slutsats

4.1 Metoddiskussion

I metoddiskussionen kommer de olika momenten som beskrivs i metod-delen att diskuteras. Eventuella svagheter och styrkor tas upp här, likväl som motiveringar till varför försöket utfördes på det sätt som gjordes.

4.1.1 Typbestämning av insamlade isolat

Agarbitarna som skars ut för typbestämning av de insamlade isolaten var inte av exakt samma storlek men det torde inte spela någon roll så länge mycel kunde växa ifrån biten ut på den nya agar där den placerades. Det skulle kunna diskuteras om en dryg vecka var tillräcklig tid för oosporer att hinna bildas, men resultatet visade att alla prover uppvisade oosporer med minst ett referensisolat.

4.1.2 Korsning av typbestämda isolat

För att få en representativ bild av verkligheten hade betydligt fler isolat krävts än de sex av varje parningstyp som användes i detta försök, med tanke på den stora genetiska variation som finns hos *P. infestans* i Sverige. Det optimala hade antagligen varit att ha en matris med lika många upprepningar av varje korsning från K0 och K2, men i det här försöket slumpades provisolaten som skulle användas fram och därmed blev matrisen utformad med en ojämn fördelning av K0 och K2. Det är möjligt att resultaten blivit mer representativa om man hade lika många upprepningar av varje korsning.

4.1.3 Fungicidbehandling av agarplattor

Koncentrationen (0,01µg aktiv substans/ml) av cyazofamid i de fungicidbehandlade agarplattorna valdes efter den förstudie som gjordes av Jönsson och Olsson (2015). I studien av Mitani *et al.* (2001) som nämns i inledningen upphörde oosporbildningen helt vid denna koncentration. I försöket rapporterat här bildades oosporer vid denna koncentration, och således var koncentration inte för hög under de förhållanden som denna studie gjordes under. Resultaten visar också att fungicid tillsats i odlingsmediet på laboratoriet har haft effekt på oosporbildningen och därmed är den valda koncentrationen berättigad. I ett liknande försök med flera olika fungicider använde sig Kessel *et al.* (2001) av en fungicidkoncentration i agarn som minskade mycellets radiala tillväxt med 75 %. Det innebär att de också valde en koncentration som hämmade, men inte stoppade tillväxten vilket ytterligare stöder valet av fungicidkoncentration.

Det hade varit intressant att använda sig av flera olika koncentrationer av cyazofamid, och även andra aktiva substanser, men tid och resurser tillät inte det. En möjlig felkälla är hur väl fungiciden diffunderat i agarn, och om den har spridit sig jämnt. Att sprida ut den utspädda fungiciden på en roterande platta med en glasmackla torde dock ge bästa möjliga förutsättningar för en jämn fördelning. Metoden att sprida ut fungiciden för att sedan låta den diffundera valdes framför att blanda in fungiciden när man tillverkar agarn därför att värmen i den processen skulle ha kunnat påverka fungiciden och dess effektivitet.

4.1.4 Räkning av oosporer

Den största felkällan i detta moment är troligen den varierande volym agar som mixades med omnimixern för varje korsning. I och med att agarn hade flutit ut ojämnt i petriskålen i en viss andel av proverna ledde det till att utstansningarna hade olika tjocklek. Det är möjligt att detta påverkade resultatet. En annan felkälla var att den andra av två Bürkerkammare som användes resulterade i betydligt fler oosporer. Det var svårt att förklara varför det blev så, men det antogs inte bero på slumpen. Det beslutades att exkludera de resultat som togs fram med den andra Bürkerkammaren för att resultaten skulle bli jämförbara. Det går också att diskutera om den mängden vatten som användes för finfördelningen av agarbitarna med oosporer var optimal. En viss andel räkningar genererade 0 oosporer vilket kan tyda på att utspädningen var för hög och att hela spannet med oosporer kanske inte fångades upp. Kontaminerade agarplattor användes inte på grund av risken att det hade påverkat oosporbildningen. Totalt uteslöts 30 agarplattor från räkning på grund av kontaminering eller uttorkning.

4.2 Resultatdiskussion

En annan studie med samma metod har inte hittats, men delar av resultaten går ändå att jämföra med andras arbete. Kuras är en potatissort med hög bladmögelresistens (Hansen *et al.*, 2005) och hur det påverkar selektionen av *P. infestans* med hänseende till oosporbildning är oklart. För att kunna jämföra med andra studier kan det dock vara av stor vikt från vilken sort isolaten är hämtade ifrån, och det är inte ofta det är presenterat. Det är oklart om resistent eller mottagliga sorter leder till störst bildning av oosporer. I en studie av Strömberg *et al.* (2001) visades att oosporbildningen påverkades av sort, temperatur och om isolaten växte under fältförhållanden eller i labb. De fann dock inget linjärt samband mellan resistens hos en sort och oosporbildning, därför är det oklart på vilket sätt mängden oosporer som har bildats i detta försök kan ha påverkats av den sort av potatis isolaten är hämtade ifrån.

Vid parningstypsbestämningen var det fem isolat (varav fyra K2 och en K0) som gav upphov till oosporer vid korsning med både A2 och A1 (tabell 2.). Detta kan orsakas av att en lesion med båda parningstyper samlades vilket gav upphov till ett blandisolat. En annan förklaring är det som Groves & Ristaino (2000) beskriver som selfing: att en individ har bildat både oogonier och anteridier och bildat oosporer asexuellt. De skriver också att fungicider verkar ha en effekt som ökar graden av selfing, vilket underbyggs av de resultat som framkommit i denna studie. Det är även tänkbart att stress, oavsett karaktär, påverkar oosporbildningen. Detta motsägs dock till viss del av resultatet i denna rapport eftersom odling på agarplattor innehållande fungicid gav upphov till en lägre oosporbildning hos K2+K2.

Totalt sett fanns det ingen skillnad i oosporbildning vid korsningar gjorda på agar med, respektive utan fungicidinblandning. De skillnader som fanns syntes bara när man delade upp resultaten mellan agar med eller utan fungicid respektive typ av korsning, såsom i figur 7 och 8.

Utifrån de resultat som framkommit här verkar oosporbildningen påverkas av om de korsade *P. infestans*-isolaten utsatts för fungicidbehandling i fält eller inte. Isolat som överlevt fungicidbehandling i fält visar större förmåga att bilda oosporer, men bara när de korsas på agar utan fungicid. Jönsson och Olsson (2015) kom i sitt magisterarbete fram till att fungicidanvändning selekterar fram aggressivitet gällande myceltillväxt, latenstid (från infektion till sporulering på blad) samt sporangiebildning. Resultaten från deras arbete kan kopplas till resultatet i detta arbete eftersom det verkar som att fungicidanvändning i fält resulterar i aggressivare isolat av *P. infestans*. Varför uppstår då effekten som visas i figur 7, där K2+K2 ger betydligt färre oosporer på den fungicidbehandlade agarplattan än på den obehandlade? Det kan kanske handla om resultatet av en

trade-off mellan mycelbildning och oosporbildning. Jönsson och Olsson (2015) visade att isolat av *P. infestans* som hade utsatts för fungicider i fält visade en högre myceltillväxt på fungicidbehandlade agarplattor än på obehandlade agarplattor. Det är därför möjligt att isolatet lägger mycket energi på myceltillväxt när det odlas på fungicidbehandlade agarplattor, vilket orsakar att oosporbildningen minskar till följd av en trade-off-effekt. En studie från Frankrike visade att det inte existerade en trade-off-effekt mellan aggressivitet hos ett isolat av *P. infestans* och dess överlevnadsförmåga mellan växtsäsonger (Montarry *et al.*, 2007). I den studien togs dock ingen hänsyn till oosporer eller sexuell förökning eftersom de endast studerade patogenens överlevnadsförmåga i levande vävnad som mycel. Resultatet som visas i figur 9 och 10 är intressanta för de visar på skillnader i förmåga att bilda oosporer hos olika isolat av *P. infestans*, oberoende av andra förutsättningar. Det hade varit intressant att jämföra oosporbildning med aggressivitet i vidare studier för att se om det finns något samband.

Om man jämför medelvärdet för oosporbildningen hos varje isolat (fig 9.) med oosporbildningen i varje individuell korsning (fig 10) ser man ingen klar korrelation. Detta kan tolkas som att det finns en ”korsningseffekt” som är oberoende av hur många oosporer ett isolat tidigare gett i en annan korsning. Olika kombinationer av föräldrar påverkar i så fall oosporbildningen på ett sätt som inte går att förutse.

Figur 8 visar att vid korsning på agar utan fungicid har det bildats mest oosporer i K2+K2 och minst i K0+K0. Detta indikerar att isolat som har utsatts för fungicider i fält bildar fler oosporer än isolat som inte har utsatts för fungicider i fält, men endast om de odlas på agarplattor utan fungicid. Det intressanta med resultaten i detta försök är att skillnaderna försvinner när isolaten odlas på en agarplatta med fungicid. Detta liknar de resultat som Kessel *et al.* (2001) kom fram till. De testade flera olika fungicider (dock ingen med cyazofamid som aktiv ingrediens) och påvisade att samtliga reducerade oosporbildning *in vitro* kraftigt. I det försök som ligger till grund för denna rapport gick det dock endast att se en skillnad mellan behandling av agarplatta i K2+K2.

Resultaten skulle i förlängningen kunna betyda att vid bekämpning av potatisbladmögel med fungicider, skapas en selektion för individer som har förmåga att bilda fler oosporer. Eftersom oosporer har förmågan att överleva i marken i flera år, utan en värdväxt, skapas en risk för högre infektionstryck tidigt på växtsäsongen när man odlar potatis på samma fält igen. Det torde dessutom finnas störst andel oosporer som har bildats från de aggressivare genotyperna. Det hela kan leda till en ond cirkel där behovet av att bekämpa patogenen hela tiden ökar samtidigt som intensifierad kemisk bekämpning driver på aggressivare populationer av *P. infestans*.

4.3 Slutsats

Resultatet visar att:

- Om isolaten har korsats på agarplattor med cyazofamid påverkas inte oosporbildningen av om föräldraisolaten har utsatts för fungicidbehandling i fält eller ej.
- Om isolaten korsats på agarplattor utan cyazofamid, bildar föräldraisolat som utsatts för fungicidbehandling i fält fler oosporer.

Man kan alltså konstatera att fungicider påverkar *P. infestans* förmåga att bilda oosporer, både när patogenen utsätts för fungicider i fält och *in vitro*.

För framtida studier hade det framförallt varit av intresse att studera om det finns något samband mellan aggressivitet hos ett isolat och dess förmåga att bilda oosporer, samt hur olika isolat påverkas av varandra när de korsas.

Referenslista

- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5 uppl. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press.
- Andersson, B. & Sandström, M. (2000). *Bladmögel och brunröta på potatis*. (Faktablad om växtskydd, jordbruk. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Andrjvon, D. (1995). Biology, Ecology, and Epidemiology of the Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in Soil. *Phytopathology*, 85(10), ss. 1053-1056.
- Avron, A.O., Boevink, P.G., Young, V., Grenville-Briggs, L.I., Van West, P., Birch, P.R. & Whisson, S.C. (2008). A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cellular microbiology*, 10(11), ss. 2271-2284.
- Cooke, L.R. & Little, G. (2002). The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Management Science*, 58(1), ss. 17-25.
- Drenth, A., Janssen, E.M. & Govers, F. (1995). Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology*, 44(1), ss. 86-94.
- Europotato.org. https://www.europotato.org/display_description.php?variety_name=Kuras [2017-01-11].
- Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular plant pathology*, 9(3), ss. 385-402.
- Groves, C.T. & Ristaino, J.B. (2000). Commercial Fungicide Formulations Induce In Vitro Oospore Formation and Phenotypic Change in Mating Type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 90(11), ss. 1201-1208.
- Hansen, J.G., Koppel, M., Valskyte, A., Turka, I. & Kapsa, J. (2005). Evaluation of foliar resistance in potato to *Phytophthora infestans* based on an international field trial network. *Plant Pathology*, 54(2), ss. 169-179.
- Hanson, K. & Shattock, R.C. (1998). Formation of oospores of *Phytophthora infestans* in cultivars of potato with different levels of race-nonspecific resistance. *Plant Pathology*, 47(2), ss. 123-129.
- JMP®, version 12 (1989-2007). [Programvara]. Cary, NC: SAS Intitute Inc.
- Jönsson, M. & Olsson, G. (2015). *Reducerade fungiciddoser vid bekämpning av potatisbladmögel*. Diss. <http://stud.epsilon.slu.se>: Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Kessel, G.J.T., Turkensteen, L.J., Schepers, H.T.A.M., Bekkum, P.J.V. & Flier, W.G. (2001). *P. infestans* oospores in the Netherlands: occurrence and effects of cultivars and fungicides. (Applied Plant Research. Wageningen.
- Mitani, S., Araki, S., Yamaguchi, T., Takii, Y., Ohshima, T. & Matsuo, M. (2001). Antifungal Activity of the Novel Fungicide Cyazofamid against *Phytophthora infestans* and Other Plant Pathogenic Fungi in Vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70, ss. 92-99.

- Mizubuti, E.S.G. & Fry, W.E. (1998). Temperature Effects on Developmental Stages of Isolates from Three Clonal Lineages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 88(8), ss. 837-843.
- Montarry, J., Corbiere, R. & Andrivon, D. (2007). Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Functional Ecology*, 21, ss. 603-610.
- Sjöholm, L., Andersson, B., Högborg, N., Widmark, A.-K. & Yuen, J. (2013). Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal biology*, 117(10), ss. 722-730.
- Strömberg, A., Boström, U. & Hallenberg, N. (2001). Oospore Germination and Formation by the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in vitro and under Field Conditions. *Phytopathology*, 149(11-12), ss. 659-664.
- Turkensteen, L.J., Flier, W.G., Wanningen, R. & Mulder, A. (2000). Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 49(6), ss. 688-696.
- Tyler, B.M. (2002). Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual review of phytopathology*, 40(1), ss. 137-167.

Tack

Jag vill först och främst rikta ett varmt tack till mina handledare, Lina och Björn, som alltid varit mycket behjälpliga när jag har behövt det. Tack också till Gabriella Olsson och Magnus Jönsson som gjorde insamlingen av infekterade blad och isoleringen av insamlade prover som en del av deras magisterarbete.